

D3

# METHOD FOR AMINATING SACCHARIDE

**Publication number:** JP3408271 (B2)

**Publication date:** 2003-05-19

**Inventor(s):** HASE SUMIHIRO

**Applicant(s):** SEIKAGAKU KOGYO CO LTD

**Classification:**

- **International:** C07B43/04; C07C213/02; C07C215/10; C07D213/74; C07F9/10; C07H15/04; C07K1/107; C07K1/113; C07K14/00; C07K2/00; C07B43/00; C07C213/00; C07C215/00; C07D213/00; C07F9/00; C07H15/00; C07K1/00; C07K14/00; C07K2/00; (IPC1-7): C07C213/02; C07C215/10; C07D213/74; C07F9/10; C07K1/107; C07K2/00; C07M5/00

- **European:**

**Application number:** JP19920212291 19920717

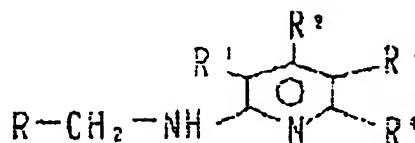
**Priority number(s):** JP19920212291 19920717

**Also published as:**

JP6040953 (A)

## Abstract of JP 6040953 (A)

**PURPOSE:** To obtain an aminated saccharide derivative useful for synthesizing a reduced end labeled saccharide and an artificial complex glucide by reducing a 2-aminopyridine derivative saccharide and decomposing the resultant compound under an alkali condition. **CONSTITUTION:** A compound of the formula (R-CH<sub>2</sub> is group derived from a saccharide of the formula R-CHO containing reduced end made into an aldehyde; R<1> to R<4> are H or lower alkyl) is reduced by using a catalyst such as palladium black at normal temperature to 100 deg.C and then decomposed in the presence of hydrazine at room temperature to 100 deg.C to give an aminated saccharide derivative of the formula R-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>.; A reduced end labeled saccharide obtained by reacting a saccharide containing an amino group at the reduced end, namely an aminated saccharide derivative with a labeled compound capable of reacting an amino group is useful for studying a receptor of a saccharide of organism tissue and studying lectin saccharide. An artificial complex glucide synthesizes neoglycoprotein, neoglycolipid, etc., and is useful as a medicine, an immune source, a studying reagent, etc.



Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-40953

(43)公開日 平成6年(1994)2月15日

(51)Int.Cl. <sup>3</sup>	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 B 43/04		7419-4H		
C 0 7 C 215/10		7457-4H		
C 0 7 H 15/04	E			
C 0 7 K 15/14		8517-4H		

審査請求 未請求 請求項の数7(全8頁)

(21)出願番号 特願平4-212291

(22)出願日 平成4年(1992)7月17日

(71)出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72)発明者 長谷 純宏

兵庫県芦屋市浜風町24-13

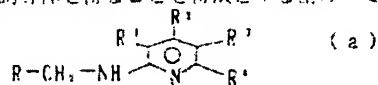
(74)代理人 弁理士 萩野 平 (外3名)

(54)【発明の名称】 糖のアミノ化法

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 簡易な方法で糖類をアミノ化してアミノ化糖誘導体を得る糖のアミノ化法を提供する。糖類の混合物から容易に単一構造のアミノ化糖誘導体及びその標識化体を製造する方法もしくは該アミノ化糖誘導体と蛋白質等の他の有機化合物と反応させて人工複合糖質を製造する方法を提供する。

【構成】 下記式(a)で表される2-アミノピリジン誘導体化糖類を還元反応に付し、次いでアルカリ条件下において分解反応に付して下記式(b)で表されるアミノ化糖誘導体を得ることを特徴とする糖のアミノ化法。

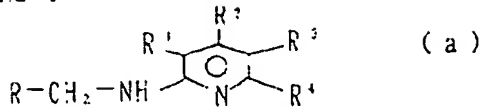


R-CH<sub>2</sub>-NH- (b) (式中、R-CH<sub>2</sub>-は還元末端がアルデヒド化されてR-CHOで示され得る糖類に由来する基 R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup> 及びR<sup>4</sup> は水素又は低級アルキル基を示す)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記化1で示される一般式(a)

【化1】



(式中、R-CH<sub>2</sub>-は、還元末端がアルデヒド化されてR-CHOで示され得る糖類に由来する基を表し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、互いに同一でも異なっても良く、各々水素、低級アルキル基から選択される基を表す。)で表される2-アミノピリジン誘導体化糖類を還元反応に付し、次いでアルカリ条件下において分解反応に付して下記一般式(b)

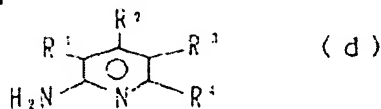
R-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (b) (式中、R-CH<sub>2</sub>-は前記と同意義)で表されるアミノ化糖誘導体を得ることを特徴とする糖のアミノ化法。

【請求項2】 アルカリ条件下での分解反応が、ヒドラジン存在下における分解反応である請求項1記載の糖のアミノ化法。

【請求項3】 請求項1の化1で示される一般式(a)の化合物は、還元末端がアルデヒド化されて下記一般式(c)

R-CHO (c) (式中、Rは糖類残基を表す。)で示され得る糖類と下記化2で示される一般式(d)

【化2】



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、互いに同一でも異なっても良く、各々水素、低級アルキル基から選択される基を表す。)で表される2-アミノピリジン誘導体とを反応させてシッフ塩基を形成させ、次いで還元反応に付して得られた2-アミノピリジン誘導体化糖類である請求項1記載の糖のアミノ化法。

【請求項4】 前記一般式(a)の化合物は、異なる構造の複数種の2-アミノピリジン誘導体化糖類の混合物を蛍光クロマトグラフィーにかけることにより得られたR基が実質的に単一の分離である2-アミノピリジン誘導体化糖類である請求項1記載の糖のアミノ化法。

【請求項5】 請求項1の一般式(b)で表される化合物と、アミノ基と反応し得る標識化合物とを反応させることを特徴とする還元末端が標識化された糖類の製造方法。

【請求項6】 標識化合物が、フルオレセインイソチオシアネート、フェニルイソチオシアネートまたはビオチンである請求項7の製造方法。

【請求項7】 請求項1の一般式(b)で表される化合物と、蛋白質、ペプチド類または脂質とを反応させるこ

とを特徴とする人工複合糖質の製造方法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、アミノ化糖誘導体を製造するための糖のアミノ化法に関し、特に、特定構造の糖類と、アミノ基と反応し得る各種試薬とを結合するために有用なアミノ化糖誘導体を提供する方法および該結合体、例えば、還元末端が標識化された糖類、人工複合糖質の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、糖類の構造とその機能の関係を研究するために、より高感度でしかも微量の試料で定量検定が可能な方法が種々提案されている。例えば、糖類の微量分析の方法としては、還元末端を糖アルコールに変換する際にトリチウムを導入し、その放射活性を利用することが挙げられる。この検出感度は、pmolレベルであり、良好であるが、放射性物質であるために種々の制約がある。

【0003】この制約がない高感度検定法として、2-アミノピリジン等の有機化合物を蛍光標識剤として使用する方法が公知である(例えば、Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 257-263(1978))。この方法は、糖又は糖類の還元末端に該2-アミノピリジンのアミノ基を反応させてシッフ塩基とし、次いで還元して、蛍光により検出するものであり、HPLCで分離し、蛍光ディテクターで検出する際の感度は数fmolレベルであることが開示されている。

【0004】しかしながら、該蛍光標識剤は、糖類の還元末端を容易に蛍光標識化し得る点では優れているが得られる蛍光標識化糖類の蛍光強度が弱く、例えば組織化学的な糖類の解析に利用するには、十分であるとは言えなかった。一方、糖類に対する抗体を作成するための免疫原として、あるいは医薬品としての用途が期待される人工的な複合糖質を合成するために、生体内等から分離された多種類の糖類を含む混合物から特定構造の糖類を分離し、構造の特定された糖類と蛋白質、ペプチド類、脂質あるいはポリマー樹脂等の有機化合物とを結合する有効な方法が求められている。この目的のために、糖類の還元末端にアミノ基を導入し、該アミノ基と上記有機化合物を結合することが可能である。単一の糖類の場合には糖類の還元末端を直接アミノ化すればよいが、天然から得られる様な多種類の糖類の混合物から特定構造の糖類を分離することは困難である。また、天然に存在するような複雑な構造の糖類を人工的に大量に合成することは、非常に時間もかかり、また極めて困難である。

【0005】従って、生体内に存在する複雑な特定構造の糖類を効率的よく分離し、単一構造の糖化合物を容易にアミノ化する方法が望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の第1の目的

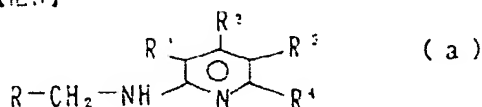
は、簡易な方法で糖類をアミノ化してアミノ化糖誘導体を得る糖のアミノ化法を提供することである。本発明の第2の目的は、糖類の混合物から容易に単一構造のアミノ化糖誘導体及びその標識化体を製造する方法もしくは該アミノ化糖誘導体と蛋白質等の他の有機化合物と反応させて人工複合糖質を製造する方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、下記化3で示される一般式(a)

【0008】

【化3】



【0009】(式中、R-CH<sub>2</sub>-は、還元末端がアルデヒド化されてR-CHOで示され得る糖類に由来する基を表し、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、互いに同一でも異なっても良く、各々水素、低級アルキル基から選択される基を表す)で表される2-アミノピリジン誘導体化糖類を還元反応に付し、次いでアルカリ条件下において分解反応に付して下記一般式(b)

R-CH<sub>2</sub>-NH (b) (式中、R-CH<sub>2</sub>-は前記と同意義)で表されるアミノ化糖誘導体を得ることを特徴とする糖のアミノ化法を提供するものである

【0010】また本発明は、上記の方法で得られた前記一般式(b)で表される化合物と、アミノ基と反応し得る標識化合物とを反応させることを特徴とする還元末端が標識化された糖類(以下、還元末端標識化糖類ともいう)の製造方法を提供するものである。さらに本発明は、上記の方法で得られた前記一般式(b)で表される化合物と、蛋白質、ペプチド類または脂質とを反応させることを特徴とする人工複合糖質の製造方法を提供するものである

【0011】すなわち本発明は、一般式(a)で表される2-アミノピリジン誘導体糖類を還元、分解して糖類の還元末端にアミノ基を導入する方法を提供するものであり、本発明では該還元反応の後、アルカリ条件下、好ましくはヒドラジン存在下で分解反応を行うことを特徴とする。ここで、本発明に使用される2-アミノピリジン誘導体化糖類は、単一種でも複数種でもよい。即ち、R基(R-CH<sub>2</sub>-基でも同じ)が、単一でもそうでなくともよい

【0012】従って、本発明においては、実質的に単一の2-アミノピリジン誘導体化糖類を出発物質として選択して、実質的に単一なアミノ化糖誘導体を得ても、多種類のアミノ化糖誘導体を得てからこれらを単一化してもよく、前者の場合では、原料の糖類を2-アミノピリジン化合物により蛍光標識し、特定構造の糖類を有する

2-アミノピリジン誘導体化糖類を分離した後、蛍光標識された糖類を還元末端にアミノ基を有する糖類に変換する方法が挙げられ、後者の場合では、生成された複数のアミノ化糖誘導体混合物を好ましくは標識してからクロマトグラフィーにより分離して単一のアミノ化糖誘導体あるいは還元末端標識化糖類およびその脱標識化によるアミノ化糖誘導体を精製度よく、かつ感度よく単離できるという著しい効果を有する

【0013】以下、本発明を具体的に説明する

【アミノ化糖誘導体(還元末端アミノ化糖)の合成】

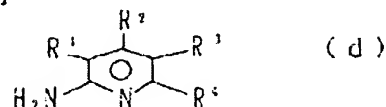
上記一般式(a)で示される2-アミノピリジン誘導体化糖類は公知の方法

【特開平1(昭64)-10177号公報; Agric. Bio. Chem., 54(8), 2169-2170 (1990); Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 257-263 (1978); J. Biochem., 90, 407-414 (1981); J. Biochem., 95, 197-203 (1984); J. Biochem., 112, No. 1, 122-126 (1992)]で合成することができる。

【0014】すなわち、下記化4で示される一般式(d)

【0015】

【化4】



【0016】(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>4</sup>は、互いに同一でも異なっても良く、各々水素、低級アルキル基から選択される基を表す)で示される2-アミノピリジン誘導体の2位のアミノ基を還元末端がアルデヒド化されて一般式(c); R-CHO (式中、Rは糖類残基を表す。ただし、R-CHOは単一の糖化合物でも複数種の糖化合物の集合でもよい)で示され得る糖類(単糖、オリゴ糖、多糖、グリコサミノグリカン等)の還元末端に反応させてシッフ塩基を形成させ、次いで還元することによってアミノアルキル(-CH<sub>2</sub>-NH-)結合を形成させて糖類と上記化合物(d)の複合体である上記一般式(a)で示される2-アミノピリジン誘導体化糖類を合成できる

【0017】本発明において、低級アルキル基とは、炭素数1~6程度のアルキル基をいい、具体的にはメチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基およびその異性体が挙げられる。本発明の糖のアミノ化法において、単一の化合物(a)を使用する場合は、好ましくは、その2-アミノピリジン誘導体化糖類混合物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等(例、逆相HPLC)の分別手段によって分離精製し、蛍光スペクトルによって目的とする複合体を検出して単一の分離を使用する方法を一例に挙げることができる

【0018】なお、上記シッフ塩基形成反応の方法とし

ては、塩酸、フッ化水素酸等の無機酸もしくは酢酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸及びヒリジン等の有機溶媒もしくは水性溶媒中、常温～100℃、数分～数時間（好ましくは、約90℃、1～3時間、pH3～6.4）の反応条件下、糖類に対して20～100当量程度の化合物(d)を使用して反応させることによってシッフ塩基を生成させる方法を例示することができる。シッフ塩基の還元には、通常シッフ塩基の還元を使用されている還元剤を使用することができ、とりわけ揮発性のボランコンプレックス（例えば、ボランジメチルアミンコンプレックス、ボラントリエチルアミンコンプレックス、ボランヒリジンコンプレックス等）、水素化ホウ素ナトリウム、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaBH<sub>4</sub>CN)等が好ましい。特に、シアル酸を含む糖類の場合には、ボランジメチルアミンコンプレックスと水と酢酸を含む還元剤で反応を行うとシアル酸の脱離を防止することができるので好ましい。還元反応は、常温～100℃、1時間～10時間（好ましくは約80～90℃、1時間程度）で完了する。

【0019】なお、上記糖類は糖蛋白質、糖脂質等の複合糖質から切り出された糖類であってもよい。複合糖質から糖類を切り出す方法としては、ヒドラジン等の塩基（アルカリ条件下）の存在下で複合糖質を分解し、必要に応じてN-アセチル化する方法（Biochem. Biophys. Acta, 121, 417-420(1966)）の他、加トリフルオロ酢酸分解する方法、酵素（エンドグリコシダーゼ、グリコペプチダーゼ、エンドグリコセラミダーゼ）等で消化する方法などが挙げられる。

【0020】本発明によって、上記一般式(a)で示される2-アミノピリジン誘導体化糖類の（置換基を有する

反応は、先ず2-アミノピリジン誘導体化糖類を還元反応に付し、次いでアルカリ条件下において分解反応に付すことによって行うことができる。上記還元反応は、酸性水溶液中（例えば、酢酸等を用いてpH3～4とする）、水素化触媒（パラジウム黒等）の存在下、水素ガスを使用して行うことができ、室温付近で数時間（好ましくは3～4時間）で完了する。

【0021】上記反応後、触媒を濾過、遠心分離等の手段で分離除去し、濃縮乾燥し、反応生成物を分離せずに引き続き、アルカリ条件下（例えば、ヒドラジン（NH<sub>2</sub>）存在下）で分解反応に付し、目的とする上記一般式(b)で示されるアミノ化糖誘導体を合成する。上記反応は、上記還元反応の生成物を、例えば水非存在下、無水ヒドラジンをを用いて室温～100℃程度（好ましくは60～100℃、より好ましくは70℃付近）の温度で数秒～1時間程度（好ましくは数分～20分程度、より好ましくは2～3分程度）加熱もしくは加温することによって行うことができる。なお、ヒドラジンは反応溶媒としても作用するので原料化合物に対して過剰量使用すればよい。アルカリ条件下での分解反応をヒドラジンをを用いて行うと、反応後に反応液を減圧処理することによってヒドラジンを除去できるので好ましいが、ヒドラジンの代わりにアンモニア水、ヒドロキシルアミン、水酸化ナトリウム等を用いて分解反応を行うこともできる。

【0022】上記の方法の反応スキームを、還元末端糖残基がN-アセチルグルコサミンである糖鎖の例について下記化5に示す。尚、\*を付した中間体は推定であり、その構造は確認されたものではない。

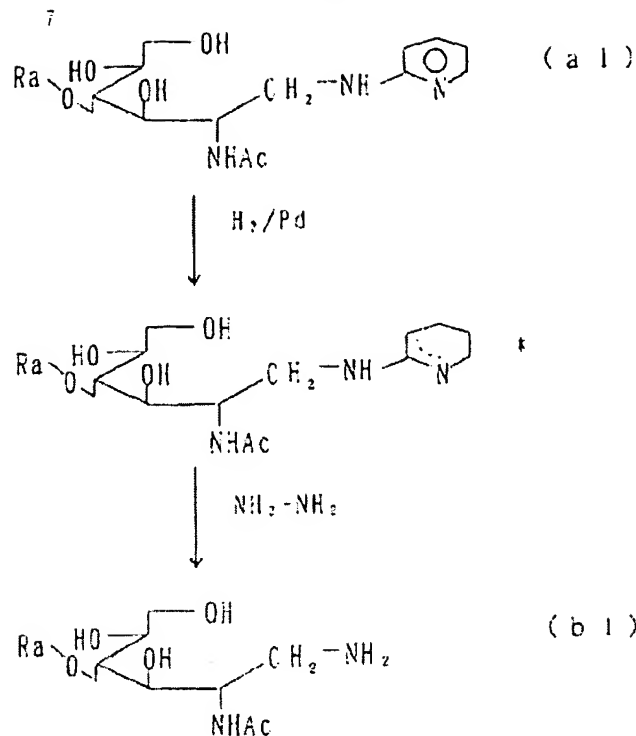
【0023】

【化5】

10

20

30



【0024】反応終了後、HPLC、TLC（薄層クロマトグラフィー）、ゲルクロマトグラフィー等のクロマトグラフィーによって目的化合物を分離精製することができる。

【還元末端標識化糖の合成】上記の本発明の方法で合成した還元末端にアミノ基を有する糖類すなわちアミノ化糖誘導体と、アミノ基と反応し得る標識化合物とを反応させることによって還元末端が標識化された糖類を合成することができる。ここで、前記クロマトグラフィーによる分離精製前にアミノ化糖誘導体のアミノ基を標識化合物、例えば、好ましくは下記例示の蛍光標識化合物等により標識化し、その蛍光により混在する複数の標識化糖誘導体を分別し、単一構造の還元末端標識化糖誘導体を分離することができる。また、所望によりこの還元末端標識化糖誘導体を脱標識してアミノ化糖誘導体を得ることができる。

【0025】かくして合成された、単一の特定の糖鎖の還元末端が標識化された標識化糖類は、生体組織中の糖類の受容体の研究、レクチンの糖結合特異性の研究に有用である。標識化合物としてはアミノ基と結合可能な官能基を有し、発蛍光基、化学発光基、発色基、放射性同位元素等を有する化合物が使用され、特に限定されない。具体的には、例えばビオチン化試薬（例えば、ビオチン・スルフォ・N-ヒドロキシスクシンイミド・エステル等の活性エステル）、フルオレセインイソチシアネート（FITC）、フェニルイソチシアネート、ダンシル（DNS）化用試薬、ジニトロフェニル（DNP）化用試薬等が挙げられる。

【0026】アミノ化糖誘導体と、アミノ基と反応し得る標識化合物とを反応させる方法は公知の方法に従って行うことができる。例えば、ビオチン・スルフォ・N-ヒドロキシスクシンイミド・エステルとの反応は弱塩基性（例、飽和炭酸水素ナトリウム溶液中）又は中性条件において室温付近で反応させ、必要に応じて酸（例、強酸性陽イオン交換樹脂）で中和する方法が挙げられる（J. Nucl. Med., 28, 1294-1302 (1987)）。また、例えば、FITCとの反応は塩基性（例、ピリジン中）又は中性条件において加熱して反応させる方法が挙げられる（Am. J. Pathol., 34, 1081 (1958)）。

【人工複合糖質の合成】上記の本発明の方法で合成した還元末端にアミノ基を有する糖類と、蛋白質、ペプチド類、脂質、ポリマー樹脂等とを、直接又は二官能性の架橋剤を介して結合することができる。このような結合物はネオグリコプロテイン、ネオグリコリピッドのような人工複合糖質として、医薬品、免疫原、研究用試薬等の種々の用途が期待される。具体的には、下記等の用途が列挙できる。

- (1) レクチン、糖結合蛋白質、抗体、糖転移酵素の生理活性物質による糖鎖の分子識別現象（特異的構造識別現象）を解析するための糖鎖プローブとしての用途
- (2) 糖鎖に対する抗体を作成するための免疫源としての用途
- (3) 糖鎖に対する抗体をELISA法等でスクリーニングするための固相化人工複合糖質としての用途
- (4) 細胞間相互作用における細胞表面糖蛋白質糖鎖の機能解析のための糖鎖プローブとしての用途

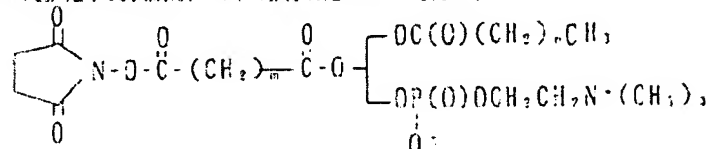
(5) 糖鎖固定アフィニティ担体としての用途

【0027】上記人工複合糖質を各用途に利用する際の形態としては、特に制限はないが、例えば、下記等が挙げられる

- ・TLCプレート上、プラスチックプレート上、各種担体に固相化（固定化）すること
- ・リボソーム、リビッドマイクロスフェアとすること

【0028】また、本発明の人工複合糖質の用途に関しては、例えば、Trends in Glycoscience and Glycotechnology (TIGG) Vol.3, No.14, 435-437(1991)、「新生物学実験講座3」糖質1 糖タンパク質、人工複合糖質

(743~760頁)（(株)東京化学同人発行）を参照することができる。架橋剤としてはジイソシアネート化合物、ジイソチオシアネート化合物、ジハロゲン化合物、グルタルアルデヒド等のアミノ基同士を架橋する架橋剤；N-(m-マレイミドベンゾイルオキシ)スクシンイミドなどのアミノ基とチオール基を架橋する架橋剤；ジカルボン酸などのアミノ基と水酸基を架橋する架橋剤が使用できる（「新生物学実験講座」5、免疫生化学\*20



(m=1~6, n=6~28、好ましくは12~20)

【0031】

【実施例】以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、かかる実施例に限定されるものではない

〔実施例1：還元末端アミノ化単糖鎖の合成〕

実施例1-1

ラクトースと2-アミノピリジン（以下「PA」と略することもある）を原料として公知の方法（Biochem. Biophys. Res. Commun., 85, 257-263(1978)）で合成した1-ピリジルアミノ-1-デオキシラクチオール〔2-アミノピリジンが結合したラクトース；以下「PA-ラクトース」ということもある〕4.5 μmolを水1mlに溶解し、酢酸を用いてpHを3に調整した。この溶液に少量のパラジウム黒を添加し、水素ガス気流中、常圧で3時間還元反応を行った。反応液をTLC [DC-Aluoflen Kieselgel 60（メルク社製）；メタノール：水：アンモニア水（6：0.3：0.1 v/v/v）を用いて展開し、硫酸を用い、加熱して目的物を発色させた]を用いて分析し、反応の経過をモニターした。反応生成物の一部（5.5 nmol）を減圧乾燥し、これに無水ヒドラジンに溶解し、これを封管中70℃で2分間加熱した。次いで過剰のヒドラジンを減圧下溜去して1-アミノ-1-デオキシラクチオールを得た（収率9

\*学研法、83~87頁、1986年、（株）東京化学同人発行）

【0029】具体的には、例えば、カルボキシル基を有する化合物（蛋白質、ペプチド類、脂質（例えば、水酸基にジカルボン酸架橋剤を導入したリゾレシチン；アミノ基にジカルボン酸架橋剤を導入したホスファチジルエタノールアミン等）のカルボキシル基をN-ヒドロキシスクシンイミドエステル（例えば、化6に記載の化合物）、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、p-ニトロフェニルエステル等の活性エステル（「ペプチド合成の基礎と実験」、1985年、丸善（株）発行）として、本発明の還元末端にアミノ基を有する糖鎖と反応させることができる。また、アミノ基を有する化合物（例えば、ホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質、あるいはタンパク質、ペプチド等）とジアルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）を反応させ、次いで、本発明の還元末端にアミノ基を有する糖鎖と反応させることもできる。

【0030】

【化6】

5%）。このものは、他の方法（Anal. Biochem., 97, 166-172(1979)）で合成した1-アミノ-1-デオキシラクチオールと同一物質であることがアミノ酸分析機で同定された。

【0032】実施例1-2

1-ピリジルアミノ-1-デオキシ-N-アセチルグルコサミンニトールを原料として、ヒドラジンによる分解を、より穏和な条件で行ったほかは上記実施例1-1と同様の方法で1-アミノ-1-デオキシ-N-アセチルグルコサミンニトール（式（b1）において、R<sub>a</sub>がHである化合物）を合成した。

【0033】〔実施例2：還元末端アミノ化オリゴ糖鎖の合成〕オボアルブミンから分離精製された下式のオリゴマンノースタイプの糖鎖（M6B）を原料として公知の方法（J. Biochem., 90, 407-414(1981)；J. Biochem., 95, 197-203(1984)）に準じて合成された還元末端残基（末端GlcNAc）に2-アミノピリジンが結合したM6B（M6B-PA）1.9 μmolを用い、実施例1と同様の方法で還元末端がアミノ化されたM6B（M6B-N）（式（b1）において、R<sub>a</sub>が下記M6Bのアミノ化される末端GlcNAcを除く部分からなる基である化合物）を合成した。なお、還元はパラジウム黒を触媒として使用し、水素ガス気流中、常圧で、3時間反応させる

ことによって行った。また、ヒドラジンによる分解は、無水ヒドラジンをを用い、封管中70℃で2時間反応させることによって行った。反応終了後、実施例1-1と同様に処理し、TLCで目的化合物を精製した（収率約50%）。

【0034】M6Bの構造：Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-2Man $\alpha$ 1-3)Man $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-4GlcNAc  
質量分析[M+N<sup>+</sup>]<sup>+</sup>：実測値m/z=1420.3  
（計算値1420.5）

【実施例3：フルオレセインイソチシアネート標識オリゴ糖の合成】実施例2で合成したM6B-N（20nmol）を含む反応液を試験管中で濃縮乾固し、これにピリジン10 $\mu$ l及びフルオレセインイソチシアネート（FITC）1.3mgを添加した。70℃で2時間加熱し、反応液を減圧下乾固した。濃縮残渣を少量の水に溶かし、TLC用プレート（DC-Alufolien Kieselgel 60, 4.5 $\times$ 7cm）に負荷し、メタノール：エタノール：酢酸（2：1：0.05v/v）で展開した。次いで蛍光性のバンドを水で溶出して還元末端残基のアミノ基がFITCで標識されたM6B（M6B-F）の水溶液を得た。

【0035】【実施例4：ビオチン標識オリゴ糖の合成】実施例2で合成したM6B-N（20nmol）を含む反応液を試験管中で濃縮乾固し、これに飽和硫酸水素ナトリウム溶液10 $\mu$ l及びビオチン・スルフォ-N-ヒドロキシスクシンイミド・エステル2mgを添加した。これを時々攪拌しながら室温で15時間反応させた。反応後、強酸性陽イオン交換樹脂ダウエクス（Dowex）50 $\times$ 2〔ダウケミカル社製、100~200メッシュ、H型〕を添加してpHを3に調整した。樹脂を濾去するとともに5倍容の水で洗浄し、濾液と洗浄液を合わせて実施例3と同様にTLCを用いて分離し、目的化合物のバンドを水で溶出し、還元末端残基のアミノ基がビオチン化されたM6B（M6B-B）の水溶液を得た。

【0036】【実施例5：人工複合糖質の合成】  
実施例5-1：アミノ化糖誘導体とリゾレシチンの複合体の合成

2-（4-ヒドロキシカルボニルブチロイル）リゾレシチン〔1位はパルミトイル基〕をDMFに溶解させ、0℃に冷却し、該リゾレシチンに対し1当量のN-ヒドロキシスクシンイミドおよび1当量のジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を加える。トリエチルアミンでpH6~7に調整し、室温で15時間攪拌する。不溶物をゼライトで濾過し、活性エステル体のDMF溶液を得る。

【0037】上記活性エステル体溶液の溶媒を留去し、該活性エステル体に対し実施例2で合成した1当量のM6B-Nの水溶液を加え、0℃で1時間、さらに室温で一晩反応させ、M6B-Nと上記リゾレシチン誘導体の

結合物を得る

実施例5-2

アミノ化糖誘導体とホスファチジルエタノールアミンの複合体の合成

クロロホルム溶液に溶解したジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンに対し1当量の無水コハク酸および2当量のトリエチルアミンを加え、室温で24時間反応させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶離液：クロロホルム-メタノール）で精製する。次いで、実施例5-2と同様に、N-ヒドロキシスクシンイミドおよびDCCを用いて活性エステル体を得、これと実施例2で合成したM6B-Nを反応させてホスファチジルエタノールアミンとの結合物を得る。

【0038】〔参考例：ドットブロット法によるレクチンの検出〕公知の方法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354(1979); Biochem. J., 257, 43-49(1989)）によってコンカナバリンA（ConA；生化学工業（株）製）をニトロセルロース膜（バイオラッド社製）上に固定し（スポットA、1 $\mu$ g（10pmol））；スポットB、0.5 $\mu$ g（5pmol））；スポットC、0.1 $\mu$ g（1pmol））、ウシ血清アルブミン（BSA）でブロッキングした。この膜を、実施例3で得たM6B-F（0.05mM）水溶液又は実施例4で得たM6B-B（0.1mM）水溶液を加えた20mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5；1mM塩化カルシウム、1mM塩化マグネシウム及び0.15M塩化ナトリウム含む）中で30分間インキュベートした。

【0039】反応後、M6B-Fを使用した場合はUVランプを照射し、ConAのスポットを肉眼的に検出した。その結果、スポットCはやや濃度が薄いもののスポットA~Cで全てConAの検出が可能であった。また、M6B-Bを使用した場合は、さらにストレプトアビジン-西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ結合物（以下「St.Av-HRP」と略す；ベクター・ラホラトリース社製）を反応させ、4-クロロ-1-ナフトールを含む基質を用いて発色させ、肉眼的に検出するか、あるいはストレプトアビジン-フルオレセイン結合物（以下、「St.Av-FITC」と略す；ピース社製）を反応させ、UVランプを照射して肉眼的に検出した。その結果、St.Av-HRPを用いた場合は、スポットCはやや濃度が薄いもののスポットA~Cで全てConAの検出が可能であり、St.Av-FITCを用いた場合は、スポットBは検出限界付近であり、スポットAは明瞭に検出された。M6B-Bの代わりに水を用いてインキュベートした対照においては、何れもConAは検出されなかった。

【0040】以上の結果、本発明による上記糖標識物を使用した場合、5pmol以下のConAがドットブロット法で検出可能であった。一方、M6B-PAを用いて同様にドットブロット法（UVランプ検出）でConAを肉眼的に検出したところ、0.5nmolが検出限



13

界であつた

【0041】

【発明の効果】ピリジルアミノ化糖鎖(2-アミノピリジン誘導体化オリゴ糖鎖)等の標識化した2-アミノ誘導体化糖は天然の複合糖質よりHPLC等を用いて単一に精製しやすい。本発明の方法でこのようなピリジルア

14

ミノ化糖鎖等から得られた還元末端にアミノ基を有する糖鎖は、標識化合物、蛋白質、ペプチド等と容易に反応させることができるので、糖鎖の単一構造に関する組織化学的研究、レクチン等の研究、ネオグリコプロテイン、ネオグリコリピッドの作成等に有用である。



Tuesday, 25 January 2011

**BY EMAIL**

[LCM@nixonvan.com](mailto:LCM@nixonvan.com)

Len Mitchard  
Nixon & Vanderhye PC  
901 North Glebe Road, 11th floor  
Arlington  
VA 22203-1808  
UNITED STATES

Your ref: 5366-7

My ref: K01.011USA

Dear Len

**BOVIN ET AL**  
**SYNTHETIC MEMBRANE ANCHORS**  
**UNITED STATES APPLICATION NO. 10/593,829**

1. I refer to your letter dated 28 December 2010.
2. A first Examination Report in respect of corresponding Japanese application no. 2007-504907 has recently issued.
3. Please find the following documents cited in the report attached:
  - i) Document D1 - Park and Huang (1993);
  - ii) Document D2 - Gallot *et al* (1986);
  - iii) Document D3 - Sumihiro (2003); and
  - iv) Document D4 - Moutad *et al* (2002).
4. Please file an Information Disclosure Statement (IDS) embodying the citations.
5. I look forward to receiving your confirmation of the filing of the IDS in due course.
6. Please acknowledge receipt of these instructions by return email.

Yours sincerely

**Stephen R Parker, PhD**  
Patent Attorney (Australia and New Zealand)

Mobile: +64 21 686 296  
Email: [stephen.parker@ippc.co.nz](mailto:stephen.parker@ippc.co.nz)  
Skype: ippc-srp